

(19) 世界知的所有権機関  
国際事務局



(43) 国際公開日  
2004 年 7 月 29 日 (29.07.2004)

PCT

(10) 国際公開番号  
WO 2004/063372 A1

- (51) 国際特許分類: C12N 15/09 (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2004/000046 (84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- (22) 国際出願日: 2004 年 1 月 7 日 (07.01.2004)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:  
特願2003-002124 2003 年 1 月 8 日 (08.01.2003) JP
- (71) 出願人 および  
(72) 発明者: 鈴木 勉 (SUZUKI, Tsutomu) [JP/JP]; 〒2770882 千葉県柏市柏市柏の葉 6-3-7 柏の葉第一住宅 703号 Chiba (JP).
- (74) 代理人: 特許業務法人特許事務所サイクス (SIKS & CO.); 〒1040031 東京都中央区京橋一丁目 8 番 7 号 京橋日殖ビル 8 階 Tokyo (JP).
- 添付公開書類:  
— 国際調査報告書
- 2 文字コード及び他の略語については、定期発行される各 PCT ガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: PROCESS FOR PRODUCING siRNA

(54) 発明の名称: siRNA の製造方法

(57) Abstract: It is intended to develop a less expensive and convenient method of transcriptionally synthesizing an siRNA. Namely, an oligonucleotide at least comprising, in the 5' to 3' -direction: (1) an antisense sequence of a target nucleic acid sequence; (2) a trimming sequence which is cleaved by a base-specific RNase; (3) a sense sequence of the target nucleic acid sequence; (4) an antisense sequence of a promoter sequence; (5) a loop-forming sequence; and (6) a sense sequence of the promoter sequence; wherein the antisense sequence of the promoter sequence and the sense sequence thereof together form a duplex via a hairpin structure in the molecule, and, upon transcription, the transcription products of the antisense sequence of the target nucleic acid sequence and the sense sequence of the target nucleic acid sequence form together a duplex via the trimming sequence in the molecule.

(57) 要約: 本発明の目的は、安価かつ簡便な siRNA の転写合成法を開発することである。本発明によれば、5' から 3' 方向に、少なくとも (1) 標的核酸配列のアンチセンス配列、(2) 塩基特異的 RNase で切断されるトリミング配列、(3) 標的核酸配列のセンス配列、(4) プロモーター配列のアンチセンス配列、(5) ループを形成する配列、および、(6) プロモーター配列のセンス配列、を含むオリゴヌクレオチドであって、プロモーター配列のアンチセンス配列とセンス配列とがヘアピン構造を介して分子内で二本鎖を形成し、かつ転写された際に標的核酸配列のアンチセンス配列と標的核酸配列のセンス配列の転写産物はトリミング配列を介して分子内で二本鎖を形成する、オリゴヌクレオチドが提供される。

BEST AVAILABLE COPY

## 明細書

## s i R N A の製造方法

## 技術分野

本発明は、s i R N A の製造方法およびそれに用いるオリゴヌクレオチドに関する。

## 背景技術

## (1) 逆遺伝学的な遺伝子の機能解析

急速な発展を成し遂げたゲノムプロジェクトは、ヒトを含めたあらゆる生物の全ゲノム DNA 配列を決定しようとしている。2001 年春に発表されたヒトゲノムの概要配列によるとヒトの全遺伝子数は 3~4 万種類程度であると見積もられている。これまでの研究では、1 万種類に満たない遺伝子について何らかの機能解析を行っているが、残りの 2~3 万の遺伝子の機能については未知であり、ヒトを理解するために、これら全遺伝子の機能を明らかにする必要がある。遺伝子の機能を明らかにするためには、それがコードする遺伝子産物、すなわち蛋白質か RNA を同定することのみならず、遺伝子の発現調節機構や他の遺伝子とのネットワークを明らかにすることが重要である。分子遺伝学はそのための有効な手段である。分子遺伝学的な手法が最も開発されている生物として大腸菌、枯草菌、酵母、線虫などのモデル生物を挙げることができる。原核生物の代表例である大腸菌と下等真核生物の代表例である酵母は古くから分子遺伝学が盛んに行われ、1997 年に大腸菌と酵母の全ゲノム塩基配列がそれぞれ決定されている。大腸菌と酵母の総遺伝子数はそれぞれ約 4300 種類と約 6100 種類であり、このうちのそれぞれ約 2000 遺伝子が機能未知遺伝子として報告された。これらの遺伝子の機能を探る手段として、非必須遺伝子の場合は遺伝子破壊による逆遺伝学的なアプローチ（ノックアウト法）が有効である。酵母に関してはゲノム 1 倍体の細胞を用いることにより、相同性組換えで比較的簡単に目的の遺伝子を破壊することができる。酵

母の非必須遺伝子約 5000 種類について、早くから破壊株が構築され、世界中の研究者がそれぞれの研究対象に用いている。大腸菌に関しても日本の研究グループがプロジェクト研究を進行中であり、もうまもなく全遺伝子破壊株のライブラリーが構築されようとしている。

## (2) RNAi の登場

また、多細胞生物のモデルであり、1000 個に満たない全ての細胞の系譜が明らかとなっている線虫に関しても、1998 年に全ゲノム配列が決定され、全 19000 遺伝子の存在が明らかとなった。線虫の遺伝子にはヒトの相同遺伝子が多量に含まれていることから、これらの遺伝子の役割を解明することはヒトの遺伝子の解析につながっている。

線虫の遺伝子欠失変異体の作成には、大腸菌や酵母で盛んに行われている通常の遺伝子破壊法ではなく、RNA 干渉 (RNA interference 又は RNAi) による遺伝子発現抑制法 (ノックダウン法) が用いられている。RNAi とは細胞に、特定の遺伝子に対するアンチセンス RNA をトランスフェクトすると、ターゲット遺伝子に特異的な発現抑制制御が起こる現象である。1998 年に 2 本鎖 RNA (dsRNA) を導入すると発現抑制の効果が数段良くなるという結果が発表された (Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E. and Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 391, 806-11)。現在ではアンチセンス RNA ではなく dsRNA 遺伝子発現抑制法を RNAi と呼ぶ。いくつかの手法が開発されているが特に線虫の卵に dsRNA をマイクロインジェクションする方法がさかんに行われ、すでに全ての遺伝子を対象にした発現抑制実験が大々的な行われ (Fraser, A.G., Kamath, R.S., Zipperlen, P., Martinez-Campos, M., Sohrmann, M. and Ahringer, J. (2000) Functional genomic analysis of *C. elegans* chromosome I by systematic RNA interference. *Nature*, 408, 325-30; 及び、Gonczy, P., Echeverri, C., Oegema, K., Coulson, A., Jones, S.J., Copley, R.R., Duperon, J., Oegema, J., Brehm, M., Cassin, E., Hannak, E., Kirkham, M., Pichler, S., Flohrs, K., Goessen,

A., Leidel, S., Alleaume, A.M., Martin, C., Ozlu, N., Bork, P. and Hyman, A.A. (2000) Functional genomic analysis of cell division in *C. elegans* using RNAi of genes on chromosome III. *Nature*, 408, 331-6)、逆遺伝学的な遺伝子の解析ツールとして一躍脚光を浴びている。

### (3) RNAi の作用メカニズム

ヒト遺伝子を逆遺伝学的に解析するためには、現状でマウスの相同遺伝子を破壊したノックアウトマウスの解析が最も有効な手段である。しかし、哺乳動物の体細胞ゲノムは2倍体であり、そのうちの一つを破壊したキメラマウスを掛け合わせることでホモのノックアウトマウスを作出するという行程が必要である。したがって、一つの遺伝子の破壊には多大な労力と資金と時間がかかるため、ポストゲノム時代に要求される網羅的かつ迅速なアプローチにはそぐわないのが実状である。RNAi は遺伝子の発現を転写レベルで抑制するため、早くから多くの研究者が哺乳動物細胞への適用を検討してきた。ところが、哺乳動物細胞においては、線虫やハエなどで行われている長い dsRNA を導入すると、タンパク質リン酸化酵素 PKR と 2', 5' -オリゴアデニレート合成酵素 (2', 5' -AS) が活性化され、塩基配列非特異的な mRNA の分解とタンパク合成のシャットダウンが生じてしまうという根本的な問題があった (Manche, L., Green, S.R., Schmedt, C. and Mathews, M.B. (1992) Interactions between double-stranded RNA regulators and the protein kinase DAI. *Mol Cell Biol*, 12, 5238-48; 及び Minks, M.A., West, D.K., Benveniste, S. and Baglioni, C. (1979) Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2', 5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. *J Biol Chem*, 254, 10180-3)。

この問題を解く鍵は、線虫における RNAi の発現抑制メカニズムの解析がもたらした。dsRNA は細胞に導入されると RNase III ファミリーに属する Dicer という dsRNA 特異的な RNA 切断酵素の作用により、21-23mer の短い二本鎖 RNA 断片にプロセスされる (Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M. and Hannon, G.J. (2001) Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference.

*Nature*, 409, 363-6 ; 及び Zamore, P. D., Tuschl, T., Sharp, P. A. and Bartel, D. P. (2000) RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101, 25-33)。各 RNA 断片のアンチセンス鎖がターゲットの mRNA に結合し、その複合体に RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれる RNA 分解酵素複合体が作用することでターゲットが破壊されるというものである (Hammond, S. M., Bernstein, E., Beach, D. and Hannon, G. J. (2000) An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404, 293-6)。さらに線虫の場合一度卵に導入すると発現抑制の持続時間が長く、世代を超えて発現抑制効果が持続することが知られているが、これは、アンチセンス鎖がターゲットの mRNA に結合した際に RNA 依存的 RNA レプリカーゼの働きにより、さらに大量の dsRNA が増幅されるという機構 (degradative PCR) によるもの (Lipardi, C., Wei, Q. and Paterson, B. M. (2001) RNAi as random degradative PCR: siRNA primers convert mRNA into dsRNAs that are degraded to generate new siRNAs. *Cell*, 107, 297-307) であることが明らかにされている。

#### (4) 哺乳動物細胞への適用—siRNA

Tuschl のグループはこのような研究結果を踏まえ、哺乳動物細胞の長い dsRNA に対する防御機構を回避するため、初めから短い dsRNA を導入することを思いついた。標的遺伝子に相補的な塩基配列を有す 21 塩基の dsRNA を数十 nM という低濃度でヒト培養細胞にトランスフェクションしたところ、標的遺伝子の特異的発現抑制が観測された (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8)。発現抑制効果を示す最も有効な RNA 長は 21mer で、3' 末に 2 塩基がオーバーハングした dsRNA であると報告されており (Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8 ; 及び

Elbashir, S.M., Lendeckel, W. and Tuschl, T. (2001b) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15, 188-200)、このような 20mer 前後の短い 2 本鎖の RNA は一般に small interfering RNA (siRNA) と呼ばれている。これまで、遺伝子の機能解析をするためには、ノックアウト技術が使用されてきたが、siRNA を使用する方法が確立されれば、大幅な実験時間の短縮とコストの削減が実現することが期待される。

#### (5) 有機合成法

21 塩基の短い RNA の作成には、ホスホアミダイト法による有機化学的に合成した RNA が広く一般に使用されている。有機合成の利点は配列の選択性がないこと(どのような配列の RNA でも合成可能である)が挙げられる。また、3' 末の 2 塩基のオーバーハングを DNA の TT にすると遺伝子発現抑制活性が若干向上することが知られている(Elbashir, S.M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K. and Tuschl, T. (2001a) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*, 411, 494-8) ことから、DNA-RNA のキメラ核酸を有機合成的に作製できることも長所として挙げられる。現在、合成 RNA の受託生産が行われており、現時点で siRNA の最も一般的な作製法である。ところが、ホスホアミダイト法による RNA の有機合成は DNA と比較して反応時間が長く合成時間がかかること、また 2' 水酸基保護基があるために脱保護に時間がかかること、さらには生産コストと品質管理コストがかかるなどの短所が指摘されている。また、最近の研究で、siRNA をデザインする際に 19 塩基の相補的な配列を標的遺伝子内のどの位置に設定するかで、遺伝子発現抑制効果に差が出ることが知られている。したがって、一般的には一つの遺伝子をノックダウンするには複数の個所に siRNA をデザインする必要があり、合成 RNA で siRNA を供給するには限界があり決して汎用的な技術とは言いがたい。

#### (6) 試験管内転写合成法

そこで、最近注目されているのは、試験管内転写反応で siRNA を作製する方法である。試験管内転写反応は合成 DNA を鋳型として酵素的に RNA を転写合成する

ため、比較的安価で合成できる上、同じデザインの有機合成 siRNA よりも遺伝子発現抑制効果が高いという報告もある。Picard らは T7 RNA ポリメラーゼを使用し、2 組の鋳型 DNA よりセンス鎖とアンチセンス鎖の 2 本の RNA を作製し、それを二本鎖化して使用している (Donze, O. and Picard, D. (2002) RNA interference in mammalian cells using siRNAs synthesized with T7 RNA polymerase. *Nucleic Acids Res*, 30, e46)。T7 RNA ポリメラーゼは開始塩基が G であると効率よく転写できるため、siRNA の 5' 末端は必ず G であるという制約付きであるものの、有機合成 siRNA よりもはるかに安価でしかも高い活性を示すという利点がある。また、最近 Ambion 社より、転写法による siRNA 作製キット (Silencer siRNA construction kit) が発売された。まずセンス鎖とアンチセンス鎖用の 2 組の鋳型 DNA を作製し、それを転写してセンス鎖 RNA とアンチセンス鎖 RNA を T7 RNA ポリメラーゼを使用して合成し、それらを 2 本鎖化して、最後に一本鎖領域を RNase 処理で取り除くことで作製する方法である。キットには T7 プロモーターを含んだ鋳型作成用合成 DNA と、鋳型作成用の酵素と試薬、転写用の T7 RNA ポリメラーゼと試薬、鋳型の消化と RNA 一本鎖領域を除去する DNase 及び RNase、siRNA の精製用カートリッジなどから構成されているが、これ以外に 29 塩基の鋳型用合成 DNA が、一デザインにつき 2 本用意する必要がある。このキットを使用する場合、鋳型作成用の合成 DNA が計 3 本必要であり、また反応ステップが煩雑という問題がある。

#### 発明の開示

本発明は上記した従来技術の問題点を解消することを解決すべき課題とした。即ち、本発明は、安価かつ簡便な siRNA の転写合成法を開発することを解決すべき課題とした。

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、本明細書の図 1 に概要を示す方法により siRNA を転写合成する方法により、安価かつ簡便に siRNA を転写合成できることを見出し、本発明を完成するに至った。

即ち、本発明によれば、5' から 3' 方向に、少なくとも

- (1) 標的核酸配列のアンチセンス配列、
- (2) 塩基特異的RNaseで切断されるトリミング配列、
- (3) 標的核酸配列のセンス配列、
- (4) プロモーター配列のアンチセンス配列、
- (5) ループを形成する配列、および、
- (6) プロモーター配列のセンス配列、

を含むオリゴヌクレオチドであって、プロモーター配列のアンチセンス配列とセンス配列とがヘアピン構造を介して分子内で二本鎖を形成し、かつ転写された際に標的核酸配列のアンチセンス配列と標的核酸配列のセンス配列の転写産物はトリミング配列を介して分子内で二本鎖を形成する、オリゴヌクレオチドが提供される。

本発明の別の態様によれば、5' から 3' 方向に、少なくとも

- (1) 標的核酸配列のアンチセンス配列、
- (2) 塩基特異的RNaseで切断されるトリミング配列、
- (3) 標的核酸配列のセンス配列、および、
- (4) プロモーター配列のアンチセンス配列、

を含むオリゴヌクレオチドであって、転写された際に標的核酸配列のアンチセンス配列と標的核酸配列のセンス配列の転写産物がトリミング配列を介して分子内で二本鎖を形成する、オリゴヌクレオチドが提供される。

上記オリゴヌクレオチドにおいては、少なくともプロモーター配列の領域が二本鎖になっていてもよい。

本発明の別の態様によれば、上記のオリゴヌクレオチドと該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖DNAが提供される。

好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、標的核酸配列のアンチセンス配列の上流の5' 末端にさらにAAの2塩基を有する。



好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドでは、RNaseで切断されるトリミング配列は、 $5' - C(D)_k CD - 3'$ （式中、DはA、T又はGを示し、kは0から100の整数を示し、 $(k+1)$ 個のDは互いに同一でも異なっている（よい）である）である。

好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドでは、RNaseで切断されるトリミング配列は $5' - CTATGCT - 3'$ である。

好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドでは、(3)標的核酸配列のセンス配列と(4)プロモーター配列のアンチセンス配列との間に $-CCC-$ が存在する。

好ましくは、プロモーター配列はT7クラスIIIプロモーター配列である。

好ましくは、(5)ループを形成する配列は、 $-GNA-$ を含む配列（NはA、T、CまたはGを示す）である。

好ましくは、本発明のオリゴヌクレオチドは、 $5' - AA -$ （標的核酸配列のアンチセンス配列） $- CTATGCT -$ （標的核酸配列のセンス配列） $- CCC - TATAGTGAGTCGTATTA - GCGAAGC - TAATACGAC TCACTATA - 3'$ で表されるオリゴヌクレオチドである。

本発明の別の側面によれば、上記した本発明のオリゴヌクレオチドを鋳型としてRNAポリメラーゼを用いて転写を行うことを含む、shRNAの製造方法が提供される。

好ましくは、転写はインビトロで行う。

好ましくは、RNAポリメラーゼとしてT7RNAポリメラーゼを使用する。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の方法により製造されるshRNAが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記の方法により製造されるshRNAを塩基特異的RNaseで処理することを含む、siRNAの製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明のオリゴヌクレオチドを鋳型としてRNAポリメラーゼを用いて転写を行ってshRNAを製造し、当該shRNA

を塩基特異的RNaseで処理することを含む、siRNAの製造方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、本発明の方法により製造されるshRNA又はsiRNAを用いて、RNAiにより標的核酸配列を含む遺伝子の発現を抑制する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、RNAポリメラーゼ及び塩基特異的RNaseを含む、本発明の方法を行うための試薬キットが提供される。

#### 図面の簡単な説明

図1は、本発明のsiRNA転写合成法の一例の概要を示す。

図2は、ラミンA/Cタンパク質を標的としたsiRNA及びshRNAの活性の比較を示す。HeLa細胞を用い、ラミンA/Cに対するsiRNA又はshRNA(各50nM)でノックダウンのち抗ラミンA/C抗体でウエスタンブロット分析を行なった。

図3は、ラミンA/Cタンパク質を標的としたsiRNA及びshRNAの活性の比較を示す。転写合成したsiRNAとshRNAは、共に有機合成siRNAよりも低濃度で効果が現れる。

#### 発明を実施するための最良の形態

##### (1) オリゴヌクレオチド

本発明のオリゴヌクレオチドは、5'から3'方向に、少なくとも、

- (1) 標的核酸配列のアンチセンス配列、
- (2) 塩基特異的RNaseで切断されるトリミング配列、
- (3) 標的核酸配列のセンス配列、
- (4) プロモーター配列のアンチセンス配列、
- (5) ループを形成する配列、および、
- (6) プロモーター配列のセンス配列、

を含むオリゴヌクレオチドである。

標的核酸配列とは、発現を抑制することを意図する遺伝子中の核酸配列である。発現を抑制することを意図する遺伝子としては任意の遺伝子を使用できる。このような標的遺伝子としては、クローニングはされているが機能が未知の遺伝子も含まれる。あるいは、標的遺伝子は、外来性レポータータンパク質またはその変異タンパク質の遺伝子であってもよい。このような外来性レポータータンパク質またはその変異タンパク質の遺伝子の核酸配列を使用した場合は、本発明の技術においてRNAi効果を容易に検出及び評価することができる。標的核酸配列の長さは、転写産物が所望のRNAi効果を達成できる限り特に限定されないが、一般的には10塩基から50塩基程度であり、好ましくは10塩基から30塩基程度であり、より好ましくは15塩基から25塩基程度である。また、標的核酸配列のセンス配列とアンチセンス配列の長さは同一であることが好ましいが、転写産物が所望のRNAi効果を発揮できる限り、長さは多少相違していてもよい。

RNaseで切断されるトリミング配列とは、塩基特異的RNaseで切断される塩基配列を意味する。

塩基特異的RNaseの種類は特に限定されないが、例えば、G特異的RNaseとしてRNaseT1、AとG特異的RNaseとしてRNaseU2、C特異的RNaseとしてRNaseCL3、CとU特異的RNaseとしてRNaseAまたはRNaseI、AとU特異的RNaseとしてRNasePhyMなどを挙げるができる。

例えば、RNaseT1などのG特異的RNaseを使用する場合には、Gを含むようにトリミング配列を設計することができ、具体的には、トリミング配列として、 $5' - C(D)_k CD - 3'$ （式中、DはA、T又はGを示し、kは0から100の整数を示し、(k+1)個のDは互いに同一でも異なってもよい）を使用することができ、一例としては、 $5' - CTATGCT - 3'$ を挙げるができる。

同様に、AとG特異的RNaseの場合には、トリミング配列として $5' - Y(R)_k YR - 3'$ を使用することができ、C特異的RNaseの場合には、ト

リミング配列として  $5' - G(H)_k GH - 3'$  を使用することができ、CとU特異的RNAseの場合には、トリミング配列として  $5' - R(Y)_k RY - 3'$  を使用することができ、AとU特異的RNAseの場合には、トリミング配列として  $5' - S(W)_k SW - 3'$  を使用することができる。ここで、YはC又はTを示し、RはA又はGを示し、HはA、C又はTを示し、SはC又はGを示し、WはA又はTを示す。

本発明で用いるプロモーター配列は、RNAポリメラーゼのプロモーターであれば特に限定されない。プロモーター配列としては、例えば、T7クラスIIプロモーター配列、SP6プロモーター配列またはT3プロモーター配列などを使用することができる。

本発明におけるループを形成する配列は、 $-GNA-$ を含む配列(Nは、A、T、C又はGを示す)であることが好ましい。このような配列を用いることにより、本発明のオリゴヌクレオチドでは、プロモーター配列のアンチセンス配列とセンス配列とがヘアピン構造を介して分子内で二本鎖を形成できる(Yoshizawa S, 他, GNA trinucleotide loop sequences producing extraordinarily stable DNA minihairpins. Biochemistry. 1997 Apr 22;36(16):4761-7)。これにより、本発明のオリゴヌクレオチドを鋳型としてRNAポリメラーゼを用いて転写を行うことにより、標的核酸配列の逆向き反復配列から成るRNAを合成することができる。また、RNAポリメラーゼを用いて転写を行うと、標的核酸配列のアンチセンス配列と標的核酸配列のセンス配列の転写産物はトリミング配列を介して分子内で二本鎖を形成するようになる。

本発明の別の態様によれば、 $5'$  から  $3'$  方向に、少なくとも

- (1) 標的核酸配列のアンチセンス配列、
- (2) 塩基特異的RNAseで切断されるトリミング配列、
- (3) 標的核酸配列のセンス配列、および、
- (4) プロモーター配列のアンチセンス配列、

を含むオリゴヌクレオチドであって、転写された際に標的核酸配列のアンチセン

ス配列と標的核酸配列のセンス配列とがトリミング配列を介して分子内で二本鎖を形成する、オリゴヌクレオチドが提供される。この場合、プロモーター配列はアンチセンス鎖の一本鎖だけなので、プロモーター配列のセンス配列を有するオリゴヌクレオチドを別に添加して二本鎖を形成してから、RNAポリメラーゼを用いて転写を行うことができる。

本発明のさらに別の態様によれば、(6)プロモーター配列のセンス配列のさらに3'末端側に、塩基配列が存在していてもよく、例えば、標的核酸配列のセンス配列および標的核酸配列のアンチセンス配列のそれぞれに相補的な塩基配列が存在していてもよい。

また、本発明の好ましい態様によれば、オリゴヌクレオチドの5'末端(即ち、標的核酸配列のアンチセンス配列の上流側)にAAの2塩基を付加することができる。

また、本発明の好ましい態様によれば、標的核酸配列のセンス配列とプロモーター配列のアンチセンス配列との間に塩基配列—CCC—を挿入することができる。このような配列を挿入することによってRNAポリメラーゼによるRNAの合成効率を高めることができる。

本発明のオリゴヌクレオチドの一例としては、5'—AA—(標的核酸配列のアンチセンス配列)—CTATGCT—(標的核酸配列のセンス配列)—CCC—TATAGTGAGTCGTATTA—GCGAAGC—TAATACGACTCACTATA—3'で表されるオリゴヌクレオチドが挙げられる。標的核酸配列が19塩基の場合の例を図1に示す。

以下、図1を参照して本発明の特に好ましい具体例についてさらに説明する。T7 RNAポリメラーゼによる試験管内転写反応では合成するRNAをコードする鋳型DNA領域は一本鎖でよく、プロモーター部分のみが二本鎖であればよいということが知られている(Milligan, J.F. and Uhlenbeck, O.C. (1989) Synthesis of small RNAs using T7 RNA polymerase. *Methods Enzymol*, 180, 51-62)。したがって、図1のような91塩基の一本鎖合成DNAを鋳型DNAとして用いることができ

る。転写合成する RNA は shRNA (small hairpin RNA) とし 19 塩基のセンス鎖-アンチセンス鎖の間を 7 塩基のループ(トリミングループ)で連結した構造である。アンチセンス鎖の 3' 末端には UU の 2 塩基のオーバーハングを施した。T7 RNA ポリメラーゼのクラス III プロモーター領域は二本鎖である必要があるため、GAA トリループによる DNA の安定なヘアピン構造(Hirao, I., Kawai, G., Yoshizawa, S., Nishimura, Y., Ishido, Y., Watanabe, K. and Miura, K. (1994) Most compact hairpin-turn structure exerted by a short DNA fragment, d(GCGAAGC) in solution: an extraordinarily stable structure resistant to nucleases and heat. *Nucleic Acids Res*, 22, 576-82) を導入した。このため、この鋳型 DNA は水溶液中で確実に図 1 のようにプロモーター領域が二本鎖の構造をとることが予想される。転写開始部位には効率のよい GGG 配列をデザインした。この鋳型は 91 塩基のうち 19 塩基のセンス鎖-アンチセンス鎖のみが任意の配列であって、それ以外の 53 塩基はすべて固定の配列である。この鋳型デザインの特徴は、一本の合成 DNA がそのまま shRNA の鋳型として機能する点であり、XXX らの方法や Ambion の転写キットが 3 本の DNA を使用することと、さらには DNA ポリメラーゼ (Klenow 酵素) による鋳型の作製行程が必要なことを考慮すると、非常に簡便でかつ合理的である。転写された shRNA はセンス鎖-アンチセンス鎖で 19 塩基の二本鎖部分を形成し、AGCAUAG (XGXXXXG) のトリミングループ部位を持っている。5' 末端には GGG の一本鎖部位を持ち、3' 末端には UU の一本鎖オーバーハングを有する。トリミングループの特徴は 4-10 塩基程度のループであり、ループの入口 5' 側から 2 番目に G さらにループの 3' 末に G を配置する必要がある。次に shRNA を リボヌクレアーゼ T1 による限定分解 (limited digestion) を用いてワンステップで siRNA に変換する。転写反応後に、反応液に直接マグネシウムイオン ( $MgCl_2$  など) を終濃度で 50-100mM 加え、反応液を氷上 (0°C) で 10 分間プレインキュベーションを行う。次に G 特異的に切断するリボヌクレアーゼ T1 (RNase T1) を加えて、氷上 (0°C) で 30~60 分反応させる。この処理で、5' 末端の GGG 配列とトリミングループの 5 塩基 CAUAG が特異的に除去される。得られた siRNA はセンス鎖-アンチ

センス鎖それぞれの 3' 末端に 2 塩基のオーバーハングが付加されている。したがって、この鋳型のデザインを用いれば、任意のターゲット配列を有する siRNA が簡便かつ効率よく合成できる。

(2) shRNA 及び siRNA の製造、並びにそれらを用いた RNAi

図 1 に関連して上記 (1) において説明した通り、本発明のオリゴヌクレオチドを鋳型として RNA ポリメラーゼを用いて転写を行うことによる shRNA を製造することができ、この方法で製造される shRNA は、ヘアピン部分に塩基特異的 RNase で切断されるトリミング配列を含んでいる点で新規であり、このような shRNA 自体も本発明の範囲内である。

本発明の方法では、転写をインビトロで行うことができる。また、RNA ポリメラーゼとしては、T7 RNA ポリメラーゼ、SP6 RNA ポリメラーゼまたは T3 RNA ポリメラーゼなどを使用することができ、中でも T7 RNA ポリメラーゼを使用することが好ましい。

RNA ポリメラーゼを用いた転写反応は当業者に既知の常法で行なうことができ、例えば、鋳型のオリゴヌクレオチドを含む溶液に、塩化マグネシウム、NTP、スペルミジン、ジチオスレイトールを加え、最後に T7 RNA ポリメラーゼを適当な濃度になるように加えて反応を行なうことができる。また、反応液中から副生成物であるピロリン酸を除去して転写反応を促進するために、ピロフォスファターゼを加えることが好ましい。このような反応混合物を 37℃ で 60 分間インキュベートすることにより転写反応を行うことができる。

さらに、上記方法により製造される shRNA を塩基特異的 RNase で処理することによって、トリミング配列が切断されて siRNA を産生することができる。塩基特異的 RNase としては、G で特異的に切断する RNase T1、C で特異的に切断する RNase CL3 などを使用することができる。また、RNase による処理は、一本鎖のループの部分のみを切断するという観点から、高濃度の塩の存在下、例えば、100 mM の  $MgCl_2$  の存在下で行なうことが好ましい。

shRNA又はsiRNAの精製は以下のように行なうことができる。まず、反応産物をフェノール処理およびクロホルム処理などの常法によりタンパク質を除去した後、15%ポリアクリルアミドゲルにロードして電気泳動し、目的のshRNAやsiRNAのバンド部分のみを切り出し、次いで、このゲルを細かくすりつぶし、適当な溶液（例えば、0.5M 塩化ナトリウム、0.1%SDS、1mM EDTAを含む溶液）中に浸し、一定時間37℃で振とうすることによってRNAをゲルから溶出させることができる。この溶液からゲルを除去した後、エタノールを加えてRNAを沈殿させ、ペレットを少量の純水に溶解して回収することにより、精製した目的RNAを得ることができる。

上記した本発明の方法で製造されるshRNA、又はsiRNAを用いて、RNAiにより標的核酸配列を含む遺伝子の発現を抑制することが可能である。

例えば、HeLa細胞などの培養細胞を用いる場合には、siRNA又はshRNAと適当なトランスフェクション試薬（例えば、OLIGOFECTAMINEなど）とを混合し、培養細胞に添加することによりsiRNA又はshRNAを培養細胞にトランスフェクションする。培養細胞は好適な条件下で培養することにより、RNAi効果が細胞内で起こり、標的核酸配列を含む遺伝子の発現が抑制される。遺伝子の発現の抑制は、RT-PCR、ノザンブロット又はウエスタンブロットなどにより確認することができ、又は発現を抑制する遺伝子の機能が判明している場合には、細胞の表現型を観察することによって確認することも可能である。

### （3）試薬キット

さらに本発明によれば、RNAポリメラーゼ及び塩基特異的RNaseを含む上記した本発明の方法を行なうための試薬キットが提供される。本発明の試薬キットには、上記酵素を用いた反応を行なうのに必要な他の試薬および／又は緩衝液を含めることができる。

例えば、RNAポリメラーゼを用いた酵素反応の反応系には、RNAポリメラーゼ以外に、塩化マグネシウム、NTP、スペルミジン、ジチオスレイトール、及びピロフオスファターゼなどを含めることができるので、これらの試薬の全て又は



一部を本発明の試薬キットに含めることができる。

以下の実施例により本発明をさらに具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

## 実施例

### ①目的

本発明の方法により作製した siRNA 及び shRNA の活性を、ラミン A/C タンパク質のノックダウンによって確認する。有機合成した siRNA との活性の比較も行う。

### ②実験方法

#### 鋳型 DNA の設計

shRNA 転写合成の鋳型となる DNA は、ホスホアミダイト法による有機合成によって製造されたもの（北海道システムサイエンス社）を用いた。鋳型 DNA の長さは 91 塩基であり、1 本鎖のまま用いた。配列は、5' -AAC TGG ACT TCC AGA AGA ACA CTA TGC TTG TTC TTC TGG AAG TCC AGC CCT ATA GTG AGT CGT ATT AGC GAA GCT AAT ACG ACT CAC TAT A-3'（配列番号 1）である。この鋳型 DNA の配列は、3' 末端側に T7 RNA ポリメラーゼのプロモーター領域（5' -TAA TAC GAC TCA CTA TA-3'）（配列番号 2）を 2 箇所相補的に配置し、この部分がヘアピン状に折りたたまれることによってプロモーター領域が 2 本鎖となるように設計した。これによって、合成 DNA を 2 本用意しなくとも T7 RNA ポリメラーゼによる認識が可能となり、コストの低減を図ることができた。さらに、T7 プロモーター領域の 2 本鎖化をより安定させるために、2 箇所の T7 プロモーター配列（センスおよびアンチセンス）の間にはヘアピン構造を安定化させる効果を有する GAA トリループを導入した。これによって、T7 RNA ポリメラーゼによる転写反応の効率の向上が期待される。

一方、鋳型 DNA の 5' 末端側にはヒトのラミン A/C タンパクをコードする DNA の配列のうちの 19 塩基の配列（5' -CTG GAC TTC CAG AAG AAC A-3'）（配列

番号3)を、5'側からセンス、アンチセンスの順に配置した。そして、センス鎖とアンチセンス鎖の間の部分にはリボヌクレアーゼ T1 による限定分解のターゲットサイトとなるべきトリミンググループ(CTATGCT)を配置した。これによって、T7 RNA ポリメラーゼによる転写産物は、トリミンググループ (AGCAUAG) を含むヘアピン構造を有する RNA (shRNA) となる。

#### 試験管内転写法による shRNA の合成

shRNA の転写合成は、上記の鋳型 DNA の濃度が 50 nM、pH7.8 の条件下で、塩化マグネシウム、NTP、スペルミジン、ジチオスレイトールを加え、最後に T7 RNA ポリメラーゼを終濃度 0.02  $\mu\text{g/mL}$  となるように加えて反応を開始させた。また、反応液中から副生成物であるピロリン酸を除去して転写反応を促進するために、酵母由来ピロフォスファターゼ (SIGMA 社) を終濃度 0.47  $\mu\text{g/mL}$  となるように加えた。これを、37℃で60分間インキュベートして転写反応を行わせた。反応混合物を12%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動にかけ、目的となる shRNA の生成が確認された。

#### shRNA の限定分解による siRNA の生成 (トリミング)

上記の転写反応液に対して、塩化マグネシウムを終濃度 100 mM になるように加えて、氷上 (0℃) で10分間ブレインキュベーションした。次に、G 特異的に切断するリボヌクレアーゼ T1 (SIGMA 社) を 30  $\mu\text{g/mL}$  となるように加えて、氷上 (0℃) で30分反応させた。これによりトリミンググループ中の2箇所の G の3'末端側のみ限定的に切断され、CAUAG の配列の部分のみ除去される。低温かつ高マグネシウム濃度のため、二本鎖を組んでいる部分は配列中に G を含んでいても切断されることはない。この反応混合物を15%ポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動にかけ、目的となる siRNA の生成が確認された。

#### 精製

上記の反応液に対してフェノール処理を2回、クロロホルム処理を1回施して除タンパクした後、15%ポリアクリルアミドゲルにロードして電気泳動し、目的の siRNA のバンド部分のみをカッターで切り出した。次にこのゲルを細かくす

りつぶし、0.5 M 塩化ナトリウム、0.1 % SDS、1 mM EDTA を含む溶液中に浸し、12 時間 37°C で振とうすることで RNA をゲルから溶出させた。この溶液からゲルを除去した後、エタノールを加えて RNA を沈殿させ、ペレットを少量の純水に溶解して回収した。

### ノックダウン

HeLa 細胞 ( $1 \times 10^4$  個) を 48 ウェルのディッシュに蒔き、0.2 ml の培地 (DMEM+10% FBS) で一晚培養した (30-50% コンフルエント)。7.4 fmol から 7.4 pmol のラミン A/C に対応した siRNA 及び shRNA に 25  $\mu$ l の OPTI-MEM I (GIBCO 社) を加えた。また、1  $\mu$ l の OLIGOFECTAMINE™ (Invitrogen 社) を 5  $\mu$ l の OPTI-MEM I で希釈し、室温で 10 分間放置した。2 つの溶液をゆっくりと混合し、さらに室温で 20 分放置した。一晚培養した細胞を OPTI-MEM で洗浄した後、それぞれのウェルに 120  $\mu$ l の OPTI-MEM を加えた。siRNA と Oligofectamine の混合液を 30  $\mu$ l 加え、ゆっくり混合した。そのまま CO2 インキュベーター中で 37°C で 4 時間保温した。225  $\mu$ l の培地 (DMEM+30% FBS) を加え、さらに 40 時間培養した。培地を除き、細胞に 50  $\mu$ l の 2x SDS-PAGE 用サンプルバッファーを加えて溶かし、エッペンドルフチューブへ移した。氷上で 10 秒  $\times$  5 回ソニケーションを行い、100°C で 1 分加熱したものを SDS-PAGE 用のサンプルとした。

### ウェスタンブロッティング

30  $\mu$ l のサンプルを 10% の SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った。6  $\times$  9 cm に切った PVDF 膜 (Immobilon™-P Transfer Membrane 0.45  $\mu$ m, MILLIPORE 社) を 100% メタノールに 2 分間浸漬させた。その後、膜を転写緩衝液 (Tris 3.03g、Glycine 14.4g、SDS 0.1g、MeOH 100ml を MilliQ で 1 L にした) で 30 分室温で振とうした。泳動の終了したゲルをセミドライ式のブロッターにセットし、膜をのせ、その上に転写緩衝液で湿らせたろ紙 (3MM、ワットマン社) を乗せた。室温で 400mA で 90 分転写した。転写後、膜を 10% スキムミルク (TBS) に浸し、37°C で 1 時間ブロッキングを行った。膜を 100 倍希釈した抗ラミン A/C1 次抗体 (Lamin A/C (636):sc-7292, Santa Cruz Biotechnology) と反応させた (室温、1 時間)。コ

ントロールとして、抗チューブリン抗体 (MONOCLONAL ANTI- $\beta$ -TUBULIN:T5293, SIGMA)を用いた。反応後に膜を TBS で 3 回洗浄し、1500 倍希釈の 2 次抗体 (Peroxidase-Congugated Rabbit Anti-Mouse Immunoglobulins:P0161, DAKO)と反応させた(室温、1 時間)。TBS で 3 回洗浄した後、ECL で発光させ、オートラジオグラフィーでラミン A/C を定量した。

### ③結果と考察

50nM の siRNA 及び shRNA の結果を図 2 に示した。いずれの細胞もチューブリンが同程度の発光を示していること、またコントロールに用いた別のターゲットに対する siRNA ではラミン A/C のノックダウンが観測されていないことから、実験は成立している。転写で作製した siRNA 及び shRNA いずれの場合も有機合成で作製した siRNA よりも活性が高いことが示された。

また siRNA の濃度を変化させてノックダウンしたデータを図 3 に示した。この結果からも、転写で作製した siRNA 及び shRNA は有機合成で作製した siRNA よりも活性が高く、5 nM 程度からノックダウンの活性が見えていることが判明した。

### 産業上の利用可能性

本発明のオリゴヌクレオチドを用いることにより、安価かつ簡便に siRNA を転写合成することが可能である。特に、本発明の利点は以下の点にある。

- (1) (実施例の場合には 91 塩基である) 鋳型 DNA を一本作製するだけでいい。
- (2) 標的核酸配列の塩基以外は固定の配列を使用できる。
- (3) はじめの塩基 (実施例では 4 4 塩基) はあらかじめ合成したものを使用するので合成時間の短縮と鋳型 DNA のコストが大幅に削減できる。
- (4) 合成 DNA をそのまま転写に使用できる。
- (5) ワンチューブでの転写合成が可能 (96 プレートでの適用可能) である。
- (6) 転写した RNA は shRNA なのでそのまま使うことも可能である。
- (7) shRNA から siRNA の変換がワンステップで行なえる。

(8) センスとアンチセンスを別々に転写していないのでアニーリング操作が不要である。

(9) 1本鎖RNAが生じないので siRNA の収量がよい。

## 請求の範囲

1. 5' から 3' 方向に、少なくとも

- (1) 標的核酸配列のアンチセンス配列、
- (2) 塩基特異的 RNase で切断されるトリミング配列、
- (3) 標的核酸配列のセンス配列、
- (4) プロモーター配列のアンチセンス配列、
- (5) ループを形成する配列、および、
- (6) プロモーター配列のセンス配列、

を含むオリゴヌクレオチドであって、プロモーター配列のアンチセンス配列とセンス配列とがヘアピン構造を介して分子内で二本鎖を形成し、かつ転写された際に標的核酸配列のアンチセンス配列と標的核酸配列のセンス配列の転写産物はトリミング配列を介して分子内で二本鎖を形成する、オリゴヌクレオチド。

2. 5' から 3' 方向に、少なくとも

- (1) 標的核酸配列のアンチセンス配列、
- (2) 塩基特異的 RNase で切断されるトリミング配列、
- (3) 標的核酸配列のセンス配列、および、
- (4) プロモーター配列のアンチセンス配列、

を含むオリゴヌクレオチドであって、転写された際に標的核酸配列のアンチセンス配列と標的核酸配列のセンス配列の転写産物がトリミング配列を介して分子内で二本鎖を形成する、オリゴヌクレオチド。

3. 少なくともプロモーター配列の領域が二本鎖になっている、請求項 2 に記載のオリゴヌクレオチド。

4. 請求項 2 に記載のオリゴヌクレオチドと該オリゴヌクレオチドと相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドとからなる二本鎖 DNA。

5. 標的核酸配列のアンチセンス配列の上流の 5' 末端にさらに AA の 2 塩基を有する請求項 1 から 4 の何れかに記載のオリゴヌクレオチド又は DNA。

6. RNaseで切断されるトリミング配列が5' - C (D)<sub>k</sub> CD - 3' (式中、DはA、T又はGを示し、kは0から100の整数を示し、(k+1)個のDは互いに同一でも異なってもよい)である、請求項1から5のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドまたはDNA。

7. RNaseで切断されるトリミング配列が5' - CTATGCT - 3'である、請求項1から6のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドまたはDNA。

8. (3) 標的核酸配列のセンス配列と(4) プロモーター配列のアンチセンス配列との間に - CCC - が存在する、請求項1から7のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドまたはDNA。

9. プロモーター配列がT7クラスIIプロモーター配列である、請求項1から8のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドまたはDNA。

10. (5) ループを形成する配列が、 - GNA - を含む配列(NはA、T、GまたはCを示す)である、請求項1から9のいずれかに記載のオリゴヌクレオチドまたはDNA。

11. 5' - AA - (標的核酸配列のアンチセンス配列) - CTATGCT - (標的核酸配列のセンス配列) - CCC - TATAGTGAGTCGTATT A - GCGAAGC - TAATACGACTCACTATA - 3' で表されるオリゴヌクレオチド。

12. 請求項1から11の何れかに記載のオリゴヌクレオチドまたはDNAを鋳型としてRNAポリメラーゼを用いて転写を行うことを含む、shRNAの製造方法。

13. 転写をインビトロで行う、請求項12に記載のshRNAの製造方法。

14. RNAポリメラーゼとしてT7RNAポリメラーゼを使用する、請求項12又は13に記載のshRNAの製造方法。

15. 請求項12から14の何れかに記載の方法により製造されるshRNA。

16. 請求項12から14の何れかに記載の方法により製造されるshRNA

Aを塩基特異的RNaseで処理することを含む、siRNAの製造方法。

17. 請求項1から11の何れかに記載のオリゴヌクレオチドを鋳型としてRNAポリメラーゼを用いて転写を行ってshRNAを製造し、当該shRNAを塩基特異的RNaseで処理することを含む、siRNAの製造方法。

18. 請求項12から14の何れかに記載の方法により製造されるshRNA、又は請求項16又は17に記載の方法により製造されたsiRNAを用いて、RNAiにより標的核酸配列を含む遺伝子の発現を抑制する方法。

19. RNAポリメラーゼ及び塩基特異的RNaseを含む、請求項12から14又は16から18の何れかに記載の方法を行うための試薬キット。



The diagram illustrates the structure of the T7 class III promoter construct. The DNA sequence is shown as follows:

```

AGCTAATACGACTCACTATA-1
A CGATTATGCTGAGTGA+1TATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNNTCGTATC
NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNA5'
  
```

Key features and labels include:

- T7クラスIIIプロモーター**: Points to the upstream sequence starting from -1.
- センス(19塩基)**: Points to the 19-base sense sequence (TATCCNNNNNNNNNNNNNNNNNN).
- アンチセンス(19塩基)**: Points to the 19-base antisense sequence (NNNNNNNNNNNNNNNNNN).
- トリミンググループ**: Points to the downstream sequence starting from +1.
- 安定なヘアピン構造**: Points to the stem-loop structure formed by the sense and antisense sequences.
- 合成効率のよいGGGスタート**: Points to the GGG start codon at position +1.

### Transcription by T7 RNA polymerase

**pppGGGNNNNNNNNNNNNNNNAGCAUAGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNUOH**

**Limited digestion by RNase T1  
(on ice, 100mM MgCl2)**

図 2

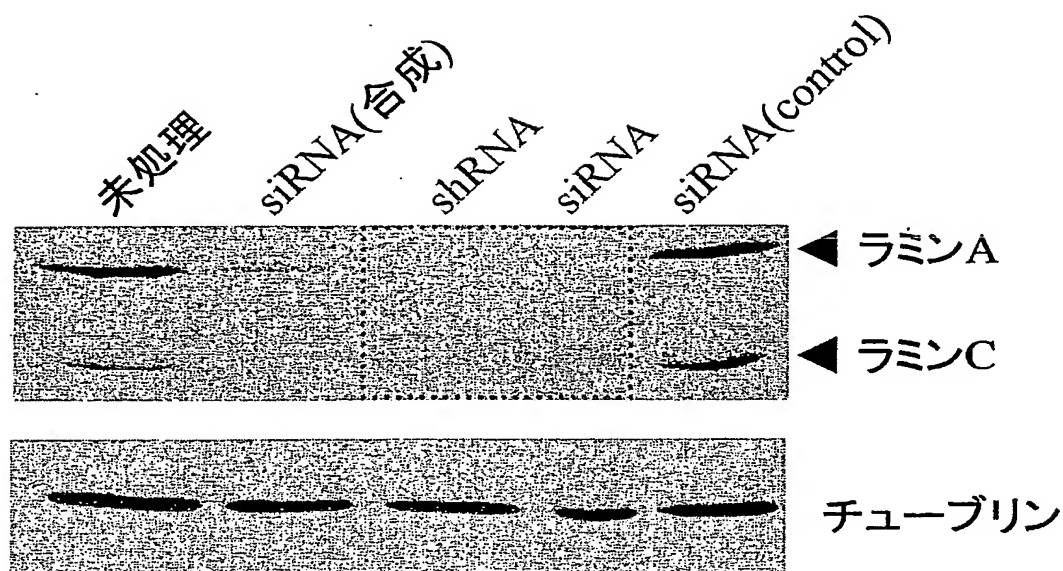
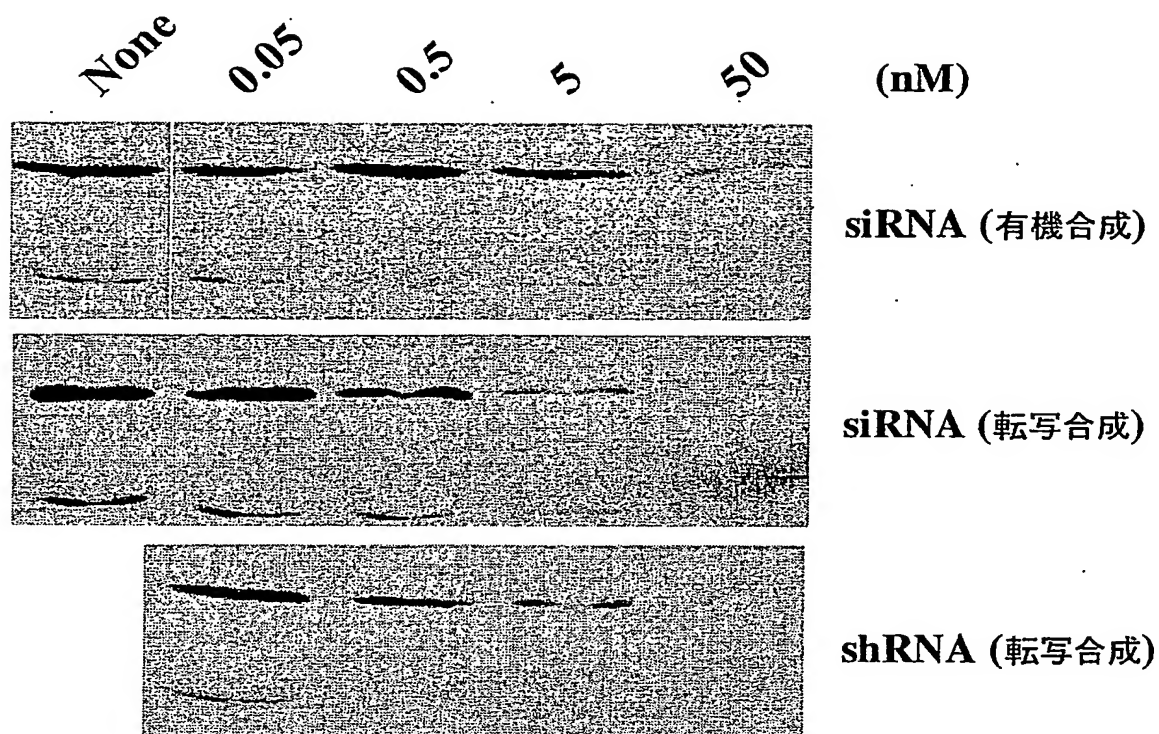


図 3



WO 2004/063372

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; iGENE

&lt;120&gt; A method for preparing siRNA

&lt;130&gt; A31662A

&lt;160&gt; 3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 91

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 1

aactggactt ccagaagaac actatgcttg ttcttctgga agtccagccc tatagtgagt 60

cgtattagcg aagctaatac gactcactat a 91

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 17

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

&lt;400&gt; 2

taatacgact cactata 17

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA

<400> 3

ctggacttcc agaagaaca

19

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000046

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER  
Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl<sup>7</sup> C12N15/09

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTplus (JOIS), CA (STN), REGISTRY (STN)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| P,X       | Katoh T. et al., Simple and rapid synthesis of siRNA derived from in vitro transcribed shRNA., Nucleic Acids Res.Suppl., September 2003, No.3, p.249-50              | 1-5,9,10,<br>12-19    |
| A         | Paddison PJ. et al., Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells., Genes Dev., 2002, Vol.16, No.8, p.948-58                    | 1-19                  |
| A         | Yu JY. et al., RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells., Proc.Natl.Acad.Sci.USA., 2002, Vol.99, No.9, p.6047-52 | 1-19                  |

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"I" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&amp;" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search  
31 March, 2004 (31.03.04)Date of mailing of the international search report  
11 May, 2004 (11.05.04)Name and mailing address of the ISA/  
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000046

## C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category* | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages   | Relevant to claim No. |
|-----------|--|-----------------------|
| A         | Takashi MORITA et al., "Honyu Dobutsu no Idenshi Kenkyu ni Katsuyo Sareru RNAi", Protein, Nucleic acid and Enzyme, 2002, Vol.47, No.14, pages 1939 to 1945 | 1-19                  |
| A         | Paul CP. et al., Effective expression of small interfering RNA in human cells., Nat.Biotechnol., 2002, Vol.20, No.5, p.505-8                               | 1-19                  |

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/000046

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:



## A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C12N15/09

## B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int Cl<sup>7</sup> C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS), CA (STN),  
REGISTRY (STN)

## C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号     |
|-----------------|--|----------------------|
| P, X            | Katoh T et al, Simple and rapid synthesis of siRNA derived from in vitro transcribed shRNA., Nucleic Acids Res Suppl., Sept. 2003, No. 3, p. 249-50. | 1-5, 9, 10,<br>12-19 |
| A               | Paddison PJ et al, Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells., Genes Dev., 2002, Vol. 16, No. 8, p. 948-58.  | 1-19                 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

## \* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&amp;」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 03. 2004

国際調査報告の発送日

11. 5. 2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9 7 3 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | Yu JY et al, RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells., Proc Natl Acad Sci U S A., 2002, Vol. 99, No. 9, p. 6047-52. | 1-19             |
| A                     | 森田隆他, 哺乳動物の遺伝子研究に活用される RNA i, 蛋白質核酸酵素, 2002, Vol. 47, No. 14, p. 1939-1945   | 1-19             |
| A                     | Paul CP et al, Effective expression of small interfering RNA in human cells., Nat Biotechnol., 2002, Vol. 20, No. 5, p. 505-8.   | 1-19             |

## 第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

## 特 許 協 力 条 約

P C T

## 国際調査報告

(法8条、法施行規則第40、41条)  
 (PCT18条、PCT規則43、44)

|                               |  |                           |
|-------------------------------|--|---------------------------|
| 出願人又は代理人<br>の書類記号 A31662A     | 今後の手続きについては、様式PCT/ISA/220<br>及び下記5を参照すること。 |                           |
| 国際出願番号<br>PCT/J P 2004/000046 | 国際出願日<br>(日.月.年) 07.01.2004                | 優先日<br>(日.月.年) 08.01.2003 |
| 出願人 (氏名又は名称)<br>鈴木 勉          |  |                           |

国際調査機関が作成したこの国際調査報告を法施行規則第41条 (PCT18条) の規定に従い出願人に送付する。  
 この写しは国際事務局にも送付される。

この国際調査報告は、全部で 4 ページである。

☐ この調査報告に引用された先行技術文献の写しも添付されている。

## 1. 国際調査報告の基礎

a. 言語は、下記に示す場合を除くほか、この国際出願がされたものに基づき国際調査を行った。

☐ この国際調査機関に提出された国際出願の翻訳文に基づき国際調査を行った。

b. ☒ この国際出願は、ヌクレオチド又はアミノ酸配列を含んでいる (第I欄参照)。

2. ☐ 請求の範囲の一部の調査ができない (第II欄参照)。

3. ☐ 発明の単一性が欠如している (第III欄参照)。

4. 発明の名称は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 次に示すように国際調査機関が作成した。

5. 要約は ☒ 出願人が提出したものを承認する。

☐ 第IV欄に示されているように、法施行規則第47条 (PCT規則38.2(b)) の規定により  
 国際調査機関が作成した。出願人は、この国際調査報告の発送の日から1カ月以内にこ  
 の国際調査機関に意見を提出することができる。

## 6. 図面に関して

a. 要約書とともに公表される図は、

第 \_\_\_\_\_ 図とする。 ☐ 出願人が示したとおりである。

☐ 出願人は図を示さなかったので、国際調査機関が選択した。

☐ 本図は発明の特徴を一層よく表しているため、国際調査機関が選択した。

b. ☒ 要約とともに公表される図はない。

## 第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ

☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット

☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期

☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))  
Int Cl<sup>1</sup> C12N15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))  
Int Cl<sup>1</sup> C12N15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)  
BIOSIS (DIALOG), WPI (DIALOG), JSTPlus (JOIS), CA (STN),  
REGISTRY (STN)

C. 関連すると認められる文献

| 引用文献の<br>カテゴリー* | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号     |
|-----------------|--|----------------------|
| P, X            | Katoh T et al, Simple and rapid synthesis of siRNA derived from in vitro transcribed shRNA., Nucleic Acids Res Suppl., Sept. 2003, No. 3, p. 249-50. | 1-5, 9, 10,<br>12-19 |
| A               | Paddison PJ et al, Short hairpin RNAs (shRNAs) induce sequence-specific silencing in mammalian cells., Genes Dev., 2002, Vol. 16, No. 8, p. 948-58.  | 1-19                 |

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

\* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31. 03. 2004

国際調査報告の発送日

11.5.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

六笠 紀子

4 B

9735

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

| C (続き) . 関連すると認められる文献 |  |                  |
|-----------------------|--|------------------|
| 引用文献の<br>カテゴリー*       | 引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示  | 関連する<br>請求の範囲の番号 |
| A                     | Yu JY et al, RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells., Proc Natl Acad Sci U S A., 2002, Vol. 99, No. 9, p. 6047-52. | 1-19             |
| A                     | 森田隆他, 哺乳動物の遺伝子研究に活用されるRNAi, 蛋白質核酸酵素, 2002, Vol. 47, No. 14, p. 1939-1945   | 1-19             |
| A                     | Paul CP et al, Effective expression of small interfering RNA in human cells., Nat Biotechnol., 2002, Vol. 20, No. 5, p. 505-8.   | 1-19             |

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**